한국인 급성골수성백혈병과 골수이형성증후군에서 Glutathione S-Transferase (GST) 유전자 결손분석

성균관의대 진단검사의학과[1], 원자력병원 진단검사의학과[2]

우희연[1] · 이경아[1] · 홍영준[2] · 박효순[1] · 김선희[1]

Glutathione S-Transferase (GST) Gene Deletions in Korean Patients with Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndrome

Hee Yeon Woo, M.D.[1], Kyung A Lee, M.D.[1], Young Jun Hong, M.D.[2], Hyosoon Park, M.D.[1], and Sun Hee Kim, M.D.[1]

Department of Laboratory Medicine[1], Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea, Department of Laboratory Medicine[2], Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

Background : There have been many studies on the association between the glutathione S-transferase (GST) genotype and the susceptibility to acute myeloid leukemia (AML)/myelodysplastic syndrome (MDS) and the results are still controversial. We tested whether the homozygous null genotype of GST mu 1 (*GSTM1*) and GST theta 1 (*GSTT1*) genes influences the risk for MDS and AML.

Methods : We analyzed bone marrow DNA samples from 54 patients with AML or MDS (14 de novo AML, 7 secondary AML, and 33 MDS) and peripheral blood DNA samples from 75 cancer-free controls. The *GSTM1* and *GSTT1* genotypes were analyzed by multiplex polymerase chain reaction (PCR).

Results : The frequencies of *GSTM1* null and *GSTT1* null were not significantly increased in AML/MDS cases compared with those in controls.

Conclusion : Our data suggest that *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes may not predispose to AML/MDS in Korean population. *(Korean J Hematol 2002;37:265 269)*

Key Words : Glutathione S-transferase (GST) gene deletion, Acute myeoloid leukemia, Myelodysplastic syndrome

서 론

급성백혈병과 골수이형성증후군의 원인이 아직까지 확실히 밝혀져 있지 않지만 benzene과 같은 화학약품이나 방사선 조사, 항암화학요법을 받은 경우에 발병 위험도가 높아지는 것으로 알려져 있다. 조혈모세포의 DNA 손상은 백혈병이나 골수이형성증후군의 발생에 필수적이며 이 과정은 여러 가지 발암물질이나 내부의 대사과정 중 생기는 독성물질에 노출되어 일어날 수 있다. 인체가 여러 가지 화학적 발암원에 노출된 후의 실제 발암과정은 발암원 자체가 가진 성질이나 노출 정도 등에 영향을 받지만, 각 개인이 가진 유전적 감수성의 차이에 의해서도 크게 영향을 받는다.[1)] 즉 독성물질을 해독하는 능력이 각 개인별로 매우 다양하며 이러한 유전적 요인에 의해 발암빈도의 차이를 보인다는 것이다. 골수이형성증후군과 급성골수성백혈병의 발생도 benzene이나 항암제 등의 화학약품과 관련이 있다고 알려져 있으므로 여러 가지 이물질 및 약물대사에 관여하는 효소 중 하나인 glutathione S-transferase (GST)의 유전형과 발병 위험도 사이에 어떤 연관성이 있을 것이라는 추측으로 이에 대한 연구가 많이 이루어져 왔으나 아직까지 확실한 연관성은 밝혀지지 않았다.[2 9)] 한편 GST의

접수 : 2002년 8월 7일, 수정 : 2002년 9월 5일
승인 : 2002년 10월 7일
책임저자 : 김선희, 성균관의대 진단검사의학과
Tel : 02)3410-2704, Fax : 02)3410-2719
E-mail : sunnyhk@smc.samsung.co.kr

동종효소인 GST m1 (*GSTM1*)과 GST theta 1 (*GSTT1*) 유전자의 결손율이 재생불량성빈혈 환자에서 유의하게 높다는 국내연구 결과는 혈액종양과 GST 유전자 결손과의 연관성을 시사하고 있다.[10] 이에 저자들은 골수이형성증후군과 급성골수성백혈병 환자들을 대상으로 GST의 유전형을 분석하여 그 유전적 다형성이 실제 암발생과 연관성이 있는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대 상

1) 환자군

골수이형성증후군 환자 33례 (남자 25례, 여자 8례, 연령 중앙치 55세, 연령범위 15 78세)과 급성골수성백혈병 환자 21례 (남자 13례, 여자 8례, 연령 중앙치 30세, 연령범위 4 81세)으로부터 초진시 얻은 골수 검체를 대상으로 하였다. 급성골수성백혈병 환자 중 7례는 이차성백혈병으로 5례는 골수이형성증후군과 연관되어 2례는 topoisomerase II inhibitor 화학요법과 연관되어 발생하였다.

2) 대조군

건강인 75례 (남자 38례, 여자 37례, 중앙치 38세, 연령범위 19 62세)으로부터 채취한 말초혈액을 대상으로 하였다.

2. 방 법

1) 염색체검사

염색체검사를 위한 골수세포의 배양은 유사분열 물질을 사용하지 않은 단기배양법, methotrexate를 이용한 동기화 고정도분염법 및 thymidine 배양법의 세 가지 방법을 동시에 시행하였으며, 제작된 슬라이드는 trypsin을 포함한 Giemsa 용액에 염색한 후 관찰하였다. 핵형표기는 인체 세포유전학 명명법에 관한 국제규약 즉, ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 1995)의 지침에 따랐다.

Table 1. Primer sequences of *GSTM1* and *GSTT1*

Gene	Primer sequences
GSTM1	5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3'
	5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3'
GSTT1	5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3'
	5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'
*CYP1A1**	5'-GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT-3'
	5'-CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC-3'

* used as an internal control for GST genotyping

2) GSTM1 및 GSTT1 유전자 다형성 분석을 위한 multiplex polymerase chain reaction (PCR)

정상 대조군 및 환자군으로부터 각각 말초혈액과 골수검체를 EDTA 항응고제가 포함된 용기에 채취하여 Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA)을 사용하여 DNA를 추출하였다. Multiplex PCR은 Abdel-Rahman 등이 보고한 방법에 따라 시행하였다.[11] GSTM1과 GSTT1에 대한 primer 구조는 Table 1과 같다. 추출된 DNA 50ng와 primer를 각각 30pmol씩 첨가하고 200 μmol/L의 dNTP, 5 μL의 10X PCR buffer, 1.5mmol/L $MgCl_2$를 혼합하여 총량이 50 μL되게 하여 DNA Thermocycler (Perkin-Elmer Cetus 9600, Norwalk, USA)를 이용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 결과 해석은 반드시 312bp (cytochrome P450 1A1, CYP1A1)의 대조염색대가 관찰되는 경우에 한하여 판독하였으며, 증폭산물인 480bp band (*GSTT1*)과 215bp band (*GSTM1*) 검출 유무에 따라 GST 유전자 결손을 결정하였다 (Fig. 1).

2) 자료분석

대조군과 환자군과의 유전인자 분포 차이는 2×2 또는 2×3 contigency table을 이용한 χ^2 검정으로 분석하였으며, 특정 유전자형에 대한 상대 위험율 (relative risk)은 교차비 (odds ratio)를 구하여 비교 분석하였다. 통계프로그램은 EpiCalc 2000 version 1.02을 사용하였다.

결 과

대조군과 환자군을 분석한 결과 *GSTM1* 및 *GSTT1* 유전자에 대한 보유형 (positive type)과 결손형 (null type)으로 구분되었다. 대조군 및 환자군에 대한 종합적인 분석결과는 Table 2에 요약하였다.

급성골수성백혈병 환자군에서 *GSTM1* 유전자 결손 빈도는 38.1%로서 대조군의 결손율 60.0%에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았다 (odds ratio; 0.41, 95% confidence interval (CI); 0.55 4.77, *P*=0.53). 원발성과 이차성 급성골수성백혈병으로 나누어 분석한 결과 각각 28.6%와 57.1%의 결손 빈도를 보여 역시 대조군과 차이가 없었다. 골수이형성증후군 환자군에서의 *GSTM1* 유전자 결손 빈도는 57.6%로서 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다 (odds ratio; 1.64, 95% CI; 0.66 4.06, *P*=0.24). *GSTT1* 유전자의 결손율도 급성골수성백혈병과 골수이형성증후군 환자군 모두에서 대조군과 통계적으로 유의한 차

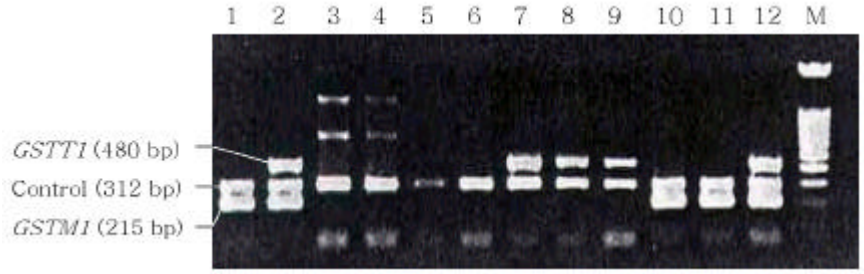

Fig. 1. Multiplex PCR products analyzed on 2% agarose gel for the detection of the *GSTM1* and *GSTT1* deletion polymorphism. Lane 1, 10, 11 show individuals with *GSTM1*+ (215bp); lane 7 9 show an individual with *GSTT1*+ (480bp); lanes 2, 12 show individuals with *GSTT1*+ and *GSTM1*+; lanes 3-6 show individuals with deletions for both *GSTM1* and *GSTT1* genes with only one band at 312 bp corresponding to the internal control.

Table 2. Frequencies of *GSTM1* and *GSTT1* gene deletions in AML or MDS patients and healthy controls

Gene deletions	*GSTM1*	*GSTT1*	*GSTM1 & GSTT1*
AML patients (N=21)	8 (38.1%)	12 (57.1%)	4 (19.9%)
Odds ratio	0.41	1.61*	0.53
Secondary AML (N=7)	4 (57.1%)	2 (28.6%)	0 (0%)
Odds ratio	0.89	0.48	-
De novo AML (N=14)	4 (28.6%)	10 (71.4%)	4 (28.6%)
Odds ratio	0.27	3.01†	0.90
MDS patients (N=33)	19 (57.6%)	19 (57.6%)	9 (27.3%)
Odds ratio	1.64‡	0.90	0.85
Controls (N=75)	45 (60.0%)	34 (45.3%)	23 (30.7%)

95% confidence interval: *0.55 4.77 (*P*=0.33); †0.77 12.68 (*P*=0.07); ‡0.66-4.06 (*P*=0.24)
Abbreviations : AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome

이를 보이지 않았다.

각 환자군을 염색체 이상이 있는 군과 없는 군으로 나누어 두 가지 유전자 결손율의 차이가 있는지 분석해 보았으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(결과 제시 안 함). 또한 5번 및 7번 염색체 단염색체(monosomy), 8번 삼염색체(trisomy), 7번 염색체의 장완 결실을 보인 군과 특정 GST 유전형과의 관련성 여부를 분석하였으나 유의한 결과를 얻을 수 없었다. 단 5번 염색체의 장완 결실을 보인 골수이형성증후군 네 증례 중 세 증례가 *GSTT1* 유전자의 결실을 보였지만 유의한 결론을 내리기에는 증례 수가 너무 작았다.

고 찰

본 연구 결과 급성골수성백혈병과 골수이형성증후군 환자에서의 *GSTM1* 및 *GSTT1* 유전자의 결손빈도가 대조군과 차이가 없는 것으로 관찰되었다. 우리나라의 *GSTT1* 및 *GSTM1* 유전자 결손율은 다른 인종에 비하여 높은 것으로 알려져 있다.[12] 본 연구에서의 대조군 결과에서도 *GSTT1* 유전자 결손율은 45.3%로서 백인의 평균 결손율 23.7%, 흑인의 21.8%, 멕시코인의 9.7%에 비해 높은 빈도를 보여주었다. *GSTM1*의 경우도 백인은 평균 50%, 흑인은 33% 정도의 결손율이 보고되고 있는데 본 연구에서는 60%로 보여 역시 비교적 높은 결손율을 보이고 있었다.

GST는 적혈구에서 생성되는 tripeptide의 일종인 glutathione을 다양한 전자친화성 물질과 결합시켜서 thioether를 형성하는 과정을 매개하며, 최종적으로 mercapuric acid를 생성함으로써 여러 돌연변이유발물질이나 발암물질의 해독작용에 관여하는 효소군이다. 이 효소군은 α (alpha), π (pi), μ (mu), θ (theta)의 네 가지 동종효소로 분류할 수 있다. 이 중 μ형 (*GSTM1*)의 유전자는 염색체 1p13.3에 위치하며, arylepoxide를 대사시키는데 효과적으로 작용하는 것으로 알려져 있다. GST θ형 (*GSTT1*)의 유전자는 염색체 22q11.2 부위에 위치하며 epoxybutane, ethylene oxide, halomethane 등이 대표적인 기질로 알려져 있으며, 다양한 악성종양의 발생과 관련된 유전자로 생각되어 주로 폐암, 방광암 등의 고형종양 발생과의 연관성에 대해 연구되어 왔다.[13-15]

GST는 조혈모세포의 여러 독성물질에 의한 DNA 손상 정도를 조절한다고 알려져 있으며, 실험적으로 *GSTM1*과 *GSTT1* 유전자가 결손된 림프구는 DNA 손상 유발물질들을 첨가하여 배양하였을 때 DNA 손상의 증거인 자매염색분체교환(sister chromatid exchange)의 빈도가 증가하는 것으로 밝혀졌다.[16] 또한 *GSTM1*과 *GSTT1* 단백질과 mRNA가 골수에 존재함이 밝혀져 혈액종양 발병 위험도와 관련이 있을 것으로 생각되고 있다.[17] 이러한 배경으로 최근에는 급성백혈병 및 골수이형성증후군 등의 혈액종양에

서의 GST 유전형에 대한 연구가 진행되고 있으나, 아직까지 그 결과에 대해서는 논란의 여지가 많다. Chen 등[2]은 백인 골수이형성증후군 환자에서의 *GSTT1* 유전자 결손율(46%)이 대조군(16%)보다 4.3배 높았다고 보고하였으며, Davies 등[3]도 백인 급성골수성백혈병/골수이형성증후군 소아 환자에서의 *GSTM1* 유전자 결손율이 대조군보다 유의하게 높았다고(64% vs 47%) 보고하였다. 일본인 골수이형성증후군 환자를 대상으로 한 두 연구에서는 서로 상반된 결과를 보였는데 Okada 등[4]은 환자와 대조군의 *GSTT1* 유전형이 차이가 없었다고 보고한 반면, Sasai 등[5]은 *GSTT1* 유전자 결손율이 환자군에서 유의하게 높았다고 보고하였다. 이 외에 Basu 등[6]은 영국 백인 급성골수성백혈병과 골수이형성증후군 환자군에서의 *GSTT1* 유전자 결손율 증가가 없었다고 보고하였다. 이러한 상반된 결과들을 보이는 이유는 분명치 않으나, 인종의 차이나 개개인의 유전적 감수성의 차이 때문일 것으로 추측되고 있다.

이차성 백혈병은 발암물질에의 폭로나 골수이형성증후군의 비교적 확실한 원인에 의한 백혈병으로 GST 유전형과 더욱 밀접한 연관이 있을 것으로 생각되어 여러 연구에서 대상으로 하였다. Sasai 등[5]은 이차성 백혈병에서의 *GSTT1* 유전자의 결손율이 대조군이나 원발성 백혈병에 비해 유의하게 높았다고 보고하였지만, Woo 등[7]과 Crump 등[8]은 아무런 차이가 없었다고 보고하여 역시 상반된 결과를 보였다. 본 연구 결과에서도 대조군과 이차성 백혈병 환자군 사이에 *GSTT1*과 *GSTM1* 유전자 결손율 차이가 없었다.

염색체 이상 유무와 *GSTT1* 유전형과의 관련성에 대한 연구 보고에 의하면 골수이형성증후군의 경우 *GSTT1* 유전자와 핵형과의 관련성은 관찰된 바 없으며, 급성골수구성백혈병에서 8번 삼염색체와 *GSTT1* 유전자 결실의 빈도가 약간의 상관성을 가지고 있다는 보고가 있었다.[5, 8, 9] 본 연구 결과 5번 염색체의 장완 결실을 보인 골수이형성증후군 네 증례 중 세 증례가 *GSTT1* 유전자의 결실을 보였지만 어떤 결론을 내리기에는 증례 수가 너무 작았다. 그 외의 염색체 이상과 GST 유전형은 아무런 관련성을 보이지 않았다.

급성골수성백혈병 및 골수이형성증후군을 유발할 수 있는 약물 및 화학물질의 종류는 매우 다양하여 GST 이외의 다른 종류의 효소가 관련될 수 있으므로 향후에는 다른 효소 유전자에 대한 연구가 동시에 이루어져야 할 것으로 생각되며 보다 많은 수의 증례에 대해 분석하여 보다 신뢰성 높은 결과를 얻는 것이 필요할 것이라 생각된다.

요 약

배 경 : 골수이형성증후군과 급성골수성백혈병의 발병 위험도와 glutathione S-transferase (GST)의 유전형 사이에 어떤 연관성이 있을 것이라는 예상 하에 이에 대한 연구가 많이 이루어져 왔으나 아직까지 확실한 연관성은 밝혀지지 않았다. 이에 저자들은 골수이형성증후군과 급성골수성백혈병 환자들을 대상으로 GST μl (*GSTM1*)와 GST θ 1 (*GSTT1*)유전자의 유전형을 분석하여 유전적 다형성이 실제 암발생과 연관성이 있는지를 알아보고자 하였다.

방 법 : 33례의 골수이형성증후군 환자, 21례의 급성골수성백혈병 환자(원발성 급성골수성백혈병 14례, 이차성 급성골수성백혈병 7례)와 건강인 75례으로부터 얻은 DNA를 대상으로 multiplex PCR을 시행하여 *GSTM1*과 *GSTT1*의 유전형을 분석하였다.

결 과 : 급성골수성백혈병과 골수이형성증후군 환자에서의 *GSTM1* 및 *GSTT1* 유전자의 결손빈도가 대조군과 차이가 없는 것으로 관찰되었다.

결 론 : 한국인에서는 *GSTM1*과 *GSTT1* 유전자의 결손이 급성골수성백혈병과 골수이형성증후군의 발병에 영향을 주지 않는 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1) Nebert DW : *Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. Mut Res 347:267-281, 1991*
2) Chen H, Sandler DP, Taylor JA, Shore DL, Liu E, Bloomfield CD, Bell DA : *Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. Lancet 347:295-297, 1996*
3) Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Radloff GA, Ross JA, Perentesis JP : *Glutathion S-transferase polymorphisms in children with myeloid leukemia: a children's cancer group study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 9:563-566, 2000*
4) Okada M, Okamoto T, Wada H, Takemoto Y, Kakishita E : *Glutathione S-transferase theta 1 gene (GSTT1) defect in Japanese patients with myelodysplastic syndromes. Int J Hematol 66:393-394, 1997*
5) Sasai Y, Horiike S, Misawa S, Kaneko H, Kobayashi M, Fujii H, Kashima K, Taniwaki M : *Genotype of glutathione S-transferase and other genetic configurations in myelodysplasia. Leuk Res 23:975-981, 1999*
6) Basu T, Gale RE, Langabeer S, Linch DC : *Glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) gene defect*

in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Lancet 349:1450, 1997

7) Woo MH, Shuster JJ, Chen C, Bach RO, Behm FG, Camitta B, Felix CA, Kamen BA, Pui CH, Raimondi SC, Winick NJ, Amylon MD, Relling MV : *Glutathione S-transferase genotypes in children who develop treatment-related acute myeloid malignancies. Leukemia 14:232-237, 2000*
8) Crump C, Chen C, Appelbaum FR, Kopecky KJ, Schwartz SM, Willman CL, Slovak ML, Weiss NS : *Glutathione S-transferase theta 1 gene deletion and risk of acute myeloid leukemia. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 9:457-460, 2000*
9) Preudhomme C, Nisse C, Hebbar M, Vanrumbeke M, Brizard A, Lai JL, Fenaux P : *Glutathione S-transferase theta 1 gene defects in myelodysplastic syndromes and their correlation with karyotype and exposure to potential carcinogens. Leukemia 11: 1580-1582, 1997*
10) Lee KA, Kim SH, Woo HY, Hong YJ, Cho HC : *Increased frequencies of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) gene deletions in Korean patients with acquired aplastic anemia. Blood 98: 3483-3485, 2001*
11) Abdel-Rahman S, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW : *A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. Cancer Lett 107:229-233, 1996*
12) Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, Lee BK, Spitz MR, Wang M, Xu X, Kelsey KT : *Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. Carcinogenesis 16: 1243-1245, 1995*
13) Salagovic J, Kalina I, Stubna J, Habalova V, Hrivnak M, Valansky L, Kohut A, Biros E : *Genetic polymorphism of glutathione S-transferase M1 and T1 as a risk factor in lung and bladder cancers. Neoplasma 45:312-317, 1998*
14) Rebbeck TR : *Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 6:733-743, 1997*
15) Hong YJ, Lee JK, Lee GH, Hong SI : *Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes on larynx cancer risk among Korean smokers. Clin Chem Lab Med 38:917-919, 2000*
16) Hallier E, Langhof T, Danappel D, Leutbecher M, Schroeder K, Goergens HW, Muller A, Bolt M : *Polymorphisms of glutathione conjugation of methyl bromide, ethylene oxide and dichloromethane in human blood: influence on the induction of sister chromatid exchange (SCE) in lymphocytes. Arch Toxicol 67:173-178, 1993*
17) Hall AG, McGuckin AG, Pearson ADJ, Cattan AR, Malcolm AJ, Reid MM : *Glutathione S transferases in bone marrow metastases of disseminated neuroblastoma. J Clin Pathol 47:468-469, 1994*